柑桔黑星病菌侵入葉片之時期及子囊殼成熟度與子囊胞子釋放之關係[1]

黃秋雄、張曉麟[2]

一、前　言

柑桔黑星病（*Guignardia citricarpa* kiely）屬潛伏性（Latent infection）病害（1,3,4,6,9）。柑桔花落，幼果時期即有蒙受病原菌感染之可能（1）。因其在葉片上之潛伏期長達1～3年（6），故葉片上鮮有病徵出現，而果實上之病徵，亦於果實成熟或貯藏期中方發生，致嚴重影響果實品質與外觀。早期認為果園枯葉上形成之柄胞子（Pycnidiospore）為其感染源（1）。後因有性世代子囊胞子（Ascospore）之發現，並經證實果園枯葉成熟子囊殼（Perithecia）釋放之子囊胞子具有病原性，始瞭解該病之感染確切來源（2,6,8,10）。

一般而言，植物病害之發生受環境因子影響甚巨。柑桔黑星病菌子囊殼之發育及子囊胞子之釋放，亦與環境因子有密切關係，瞭解環境因子對黑星病菌與寄主植物之變化，在病害防治上至為重要。根據 Kiely 氏報告，溫度及土壤濕度影響黑星病之發生（7）。露水（6）及下雨（11）影響病原菌子囊胞子形成與釋放。Mc Onie 氏謂南非一帶，子囊殼終年可在果園枯葉上產生，利用胞子採集器（Hirst spore trap）收集空中浮游子囊胞子之結果，顯示子囊胞子釋放集中於當地11月、12月及1月時期（11）。然而子囊胞子之釋放與消長受氣象因子支配，因地而異。在本省，柑桔黑星病之研究頗多（1,2,3,4,5,8），但有關病原菌子囊胞子在果園之消長及其影響因子之報告，則尚缺乏。

本試驗乃利用胞子採集器收集果園內空中浮游子囊胞子，以瞭解子囊胞子在果園之消長情形。定期收集果園枯葉鏡檢子囊殼成熟度，觀察氣象因子對子囊殼發育與子囊胞子之影響，並利用組織分離法，探討黑星病菌侵入葉片之時期，供預防上之參考。

二、試驗材料與方法

本試驗胞子採集器之設置及病害標本之收集，均於新竹新埔椪柑果園內進行，茲分項說明於次。

1．果園內空中浮游子囊胞子之採集：

於果園之中心設置胞子採集器一架，每天在一定時間內，將經過10% Gelvatol 處理及塗有凡士林之玻片（76×26mm）置於採集器內，經過24小時後，取下保存，每隔2～3星期攜回室內，用0.1% Cotton-blue lactophenol 染色後鏡檢，觀察每日收集之子囊胞子數。根據胞子採集器之使用說明，計算每日每 m^3 空氣內含有之子囊胞子數。（$N=\frac{M}{A\times hr}$，N：每日每 m^3 空氣內含有之胞子數，M：每日收集之胞子總數，A：胞子採集器每小時吸收之空氣量為$0.6m^3$，hr：每日收集胞子時數）。為瞭解氣象因子對子囊胞子消長之影響，並記載果園內之降雨量、露水及溫度。

2．果園枯葉子囊殼成熟度之調查：

每月一至二次，前往果園內收集具有黑點狀之柑桔枯葉約50片，攜回室內，挑取枯葉上之黑點，用0.1% Cotton-blue lactophenol 染色鏡檢，依不同成熟度分成三級：（1）無子囊和子囊胞子

本文承中國農村復興委員會邱博士人璋，本所植病系胡主任開仁、簡錦忠先生及朱啓魯先生等悉心指正，試驗期間，承李永松先生之協助，謹此致謝。

1　試驗報告農試字第五八七號。　　2　臺灣省農業試驗所植物病理系技佐。

，（2）含子囊，（3）成熟子囊與子囊胞子。

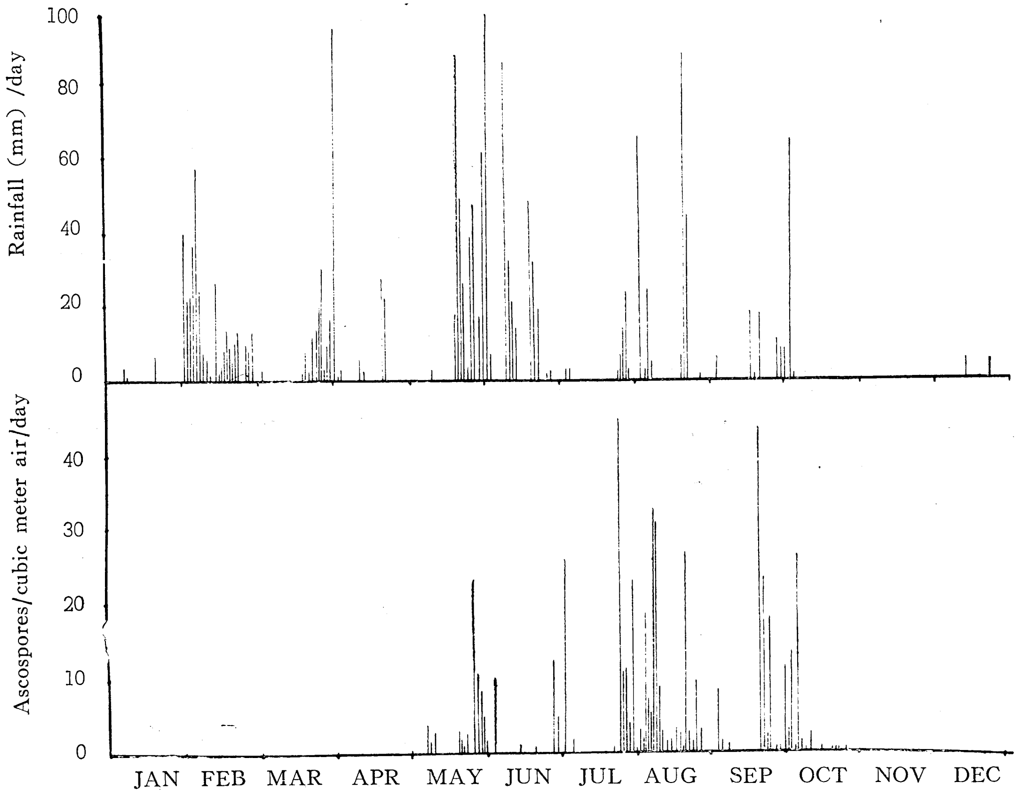
3．病原菌侵入葉片時期之探討：

於果園內選取固定10棵柑桔樹，在不同時期之春梢、夏梢及秋梢，每次逢機採集葉片50片，利用組織分離法，逢機切取直徑約 0.3mm 之組織共100塊，培養於 PDA (Potato Dextrose Agar) 上，置於 26°C 之定溫箱，經 1～2 星期後檢查黑星病菌出現之菌落數，以推測該菌侵入葉片之時期。

三、 試驗結果

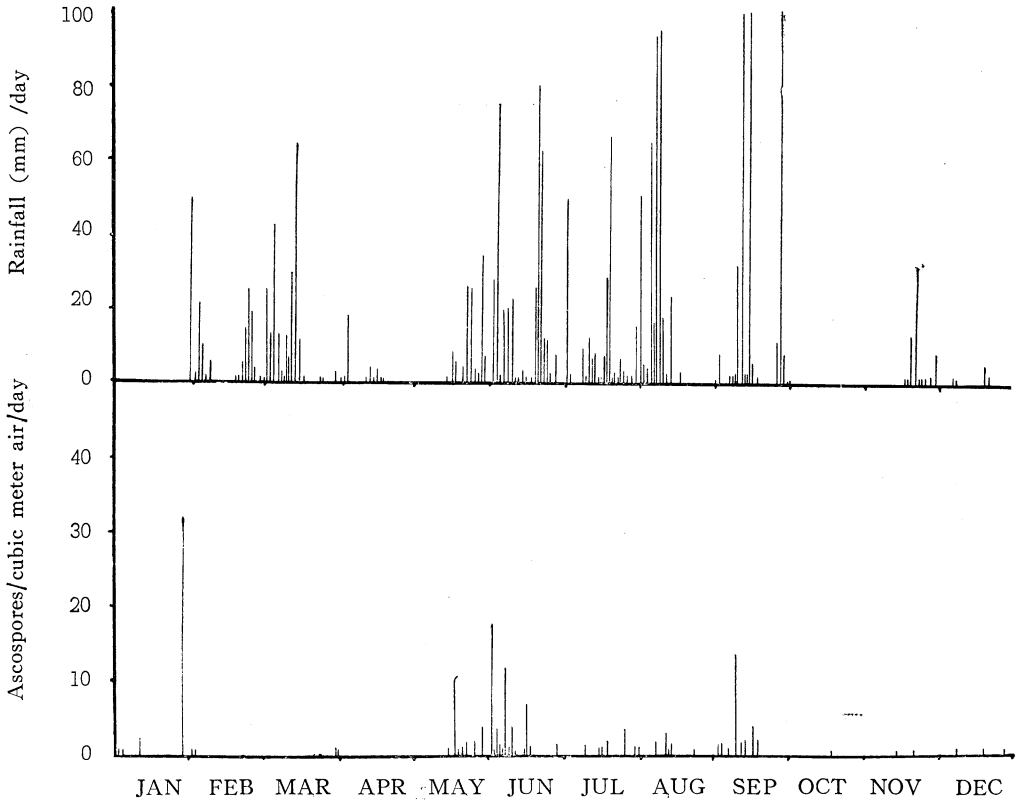
1. 果園內空中浮游子囊胞子之消長情形：

本試驗自57年～59年，共進行三年之久，其結果如圖一、圖二及圖三。試驗過程中，因部份人為及氣象因子造成胞子採集器故障，或玻片模糊無法鏡檢者，其結果均視為無胞子出現，如圖二、58年9月底與10月初之間顯示之結果，係因該年9月26日颱風來襲，致採集器故障，無法採集胞子之故。就三年採集結果及氣象資料記載之分析，子囊胞子之釋放與下雨、溫度及露水有關。通常本省自5月以後溫度較高，雨量分配較均勻，因此子囊胞子之釋放，自5月下旬開始，一直延續至9月底或10月初，而後漸漸減少。一般而言，1～4月子囊胞子出現少，但從圖二、顯示，該年1月28日採集結果，其收集數達 32 Ascospores/m^3 air ，是否受其他因子之影響，頗值探討。一年之中，6～9月胞子出現率最高，如圖四、所示。



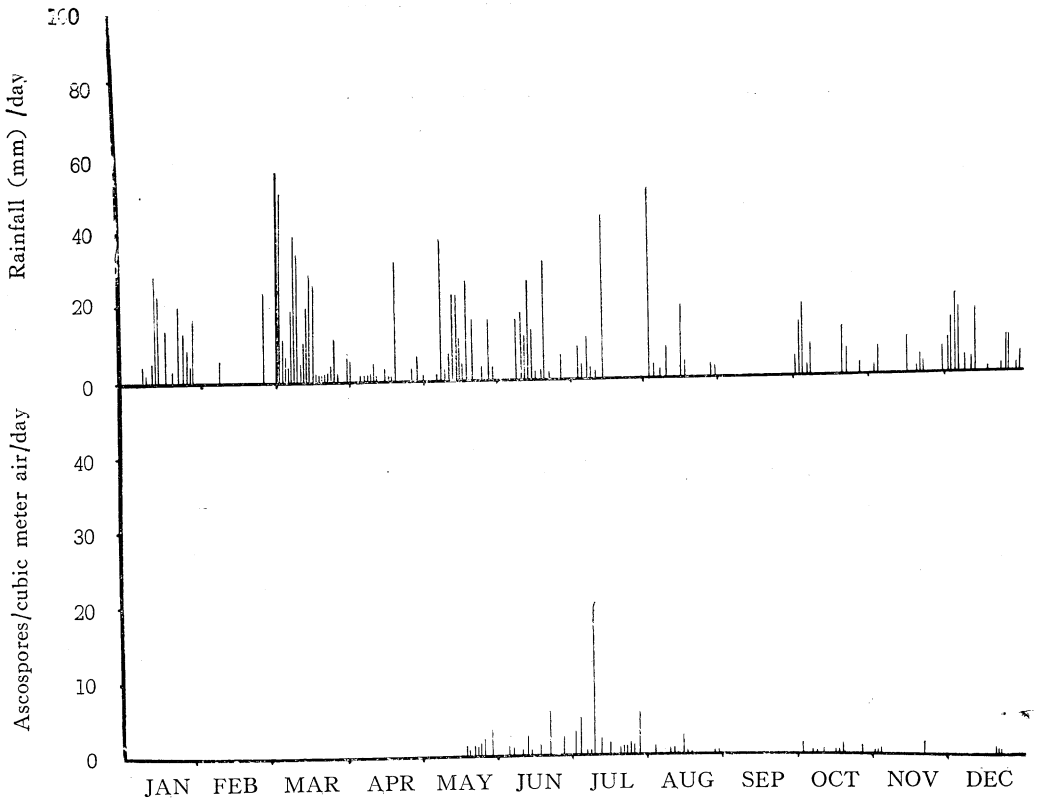
圖一、57年度新竹新埔柑桔果園黑星病菌子囊胞子釋放與雨量之關係。

Figure 1. The relationship between discharge of *Guignardia citricarpa* ascospores and rainfall. Spore trapping was made from Jan. to Dec. of 1968.



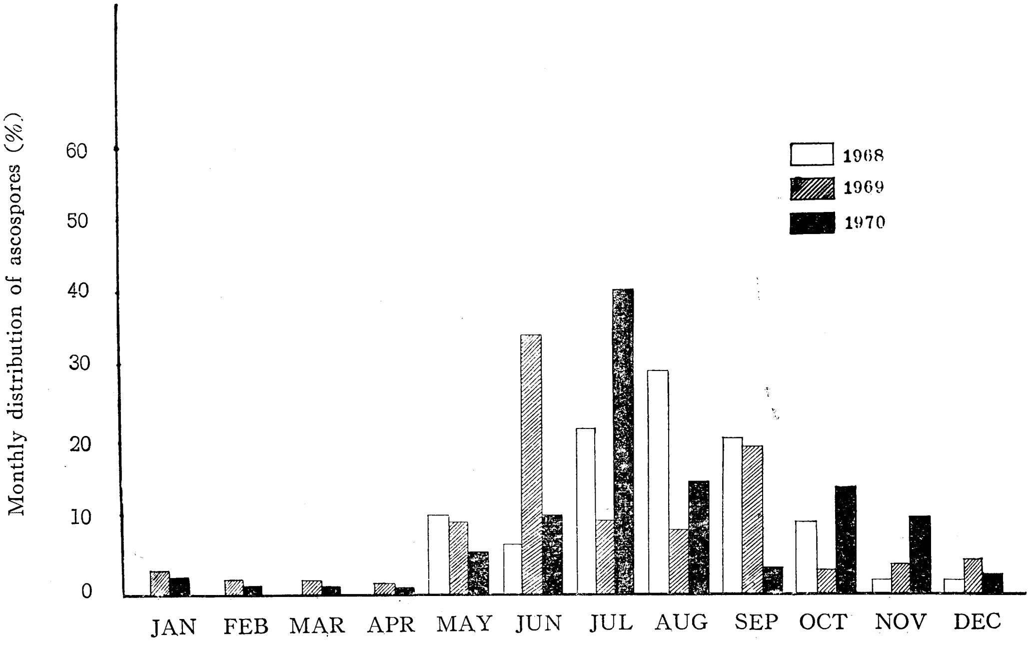
圖二、58年度新竹新埔柑桔果園黑星病菌子囊胞子釋放與雨量之關係。

Figure 2. The relationship between discharge of *Guignardia citricarpa* ascospores and rainfall. Spore trapping was made from Jan. to Dec. of 1969.



圖三、59年度新竹新埔柑桔果園黑星病菌子囊胞子釋放與雨量之關係

Figure 3. The relationship between discharge of *Guignardia citricarpa* ascospores and rainfall. Spore trapping was made from Jan. to Dec. of 1970.



圖四、57年至59年新埔柑桔果園黑星病菌空中浮游子囊胞子每月出現之百分率。

Figure 4. Monthly distribution of ascospore discharge of *Guignardia citricarpa* as determined by spore trapping made in Hsin-pu orchard from 1968 to 1970.

2. 果園枯葉子囊殼成熟度之調查：

爲瞭解柑桔枯葉上子囊殼成熟度與子囊胞子釋放之關係，59年度開始進行該項調查，除新埔果園外，同時於臺中及嘉義兩處果園進行調查。通常1～4月間，子囊殼形成率低，7～9月爲子囊胞子釋放時期，但因溫度高，雨量多，且分配較均勻，果園落葉數日後即腐爛或埋藏於泥土裡，殊難收集完整枯葉。臺中及嘉義兩處所作調查，因收集數量太少，次數不夠密集，致未能獲得一致之結果。僅就新埔地區調查之結果列表於後：

表一、59年度新竹新埔果園枯葉子囊殼成熟度調查

Table 1. Perithecial development of *G. citricarpa* on dropping leaves of Citrus in Hsin-pu orchard in different times of 1970.

收集日期 Date of collection	收集葉片總數 Total leaves collected	子囊殼成熟度等級 (Stages of development of perithecia)		
		無子囊和子囊胞子 Without asci & ascospores (%)	含子囊 With asci (%)	成熟子囊和子囊胞子 With asci & ascospores (%)
Jan. 21	50	6.0	78.0	16.0
Feb. 27	50	62.0	6.0	32.0
Mar. 24	50	80.0	12.0	8.0
Apr. 29	42	47.7	47.6	4.7
May 16	30	56.7	33.3	10.0
May 31	50	54.0	40.0	6.0
June 18	30	26.7	10.0	63.3
July 8	10	40.0	30.0	30.0
July 22	40	50.0	25.0	25.0
Aug. 22	30	76.8	6.6	16.6
Sep. 14	50	62.0	2.0	36.0
Oct. 14	20	80.0	20.0	0
Nov. 8	30	3.4	90.0	6.6
Nov. 26	50	62.0	38.0	0
Dec. 23	40	37.5	60.0	2.5

3. 病原菌侵入葉片時期之探討：

利用組織分離法，從健全柑桔葉片分離黑星病菌落數，所得結果如表二及表三。通常春梢萌芽時期約在三月底或四月初，而組織分離所得結果顯示，在五月下旬或六月初可獲得多量黑星病菌落數。夏梢及秋梢萌芽時期，分別在五月下旬及八月中旬左右，萌芽後約一個月即可分離多量病原菌菌落數。從分離而得之不同菌株，通常在培養基上表現兩種不同類型，即生長快速型及生長緩慢型，前者可在培養基上發現子囊及子囊胞子，而後者只產生較多之柄胞子。

表二、58年度新竹新埔椪柑葉片不同時期分離黑星病菌之結果（菌落數/100組織塊）

Table 2. Isolation of *G. citricarpa* from Ponkan leaves collected in different times from Hsin-pu orchard in 1969. (colonies/100 tissue pieces*)

分離菌落數 No. of colonies / 不同梢期 Type of buds	分離日期 (Date of isolation)										
	Apr. 13	May 1	May 31	June 18	July 8	July 22	Aug. 21	Sept. 14	Oct. 14	Nov. 5	Nov. 26
春梢 Spring bud	0	2	16	10	7	17	23	—	—	—	—
夏梢 Summer bud	—	—	—	—	1	3	11	11	—	—	—
秋梢 Fall bud	—	—	—	—	—	—	—	16	19	15	17

* Diameter of tissue pieces : 0.3mm.

表三、59年度新竹新埔椪柑葉片不同時期分離黑星病菌之結果（菌落數/100組織塊）

Table 3. Isolation of *G. citricarpa* from Ponkan leaves collected in different times from Hsin-pu orchard in 1970. (colonies/100 tissue pieces *)

分離菌落數 No. of colonies / 不同梢期 Type of buds	分離日期 (Date of isolation)										
	Apr. 15	May 5	June 9	June 16	July 14	Aug. 11	Aug. 24	Sept. 14	Oct. 13	Nov. 12	Dec. 3
春梢 Spring bud	1	2	3	8	6	12	—	—	—	—	—
夏梢 Summer bud	—	—	—	—	3	—	7	17	18	16	22
秋梢 Fall bud	—	—	—	—	—	—	0	5	11	12	19

* Diameter of tissue pieces=0.3mm.

四、討　論

柑桔黑星病之感染源爲果園枯葉上病原菌成熟子囊殼釋放之子囊胞子 (6,8,10,11)。果園中子囊胞子之消長，直接影響果實及葉片侵入期。在本省新竹新埔黑星病菌子囊胞子之出現，自五月下旬至九月底或十月初，其持續時期長達4個月。從過去不同時期之藥劑撒佈、套袋試驗(8)及葉片組織分離之結果，顯示果實及葉片之初次侵入期與子囊胞子開始釋放之時期相吻合。由於果實成熟具有抵抗性 (2,11)，據李氏報告，果實成熟抵抗性之時期，約在八月中旬與十月初之間(2)。若就子囊胞子之釋放時期觀之，則黑星病可能有數次果實侵入期，而其時期則介於五月下旬至八月之間。

氣象因子影響黑星病菌子囊殼發育與子囊胞子之釋放。Kiely 氏利用乾濕交替法 (Periodic wetting and drying)，處理收集之果園落葉，誘導子囊殼形成(6)，可知乾、濕狀況下有利於該病菌子囊殼之發育。Mc Onie 氏謂下雨影響子囊胞子之釋放，大量子囊胞子釋放緊跟着下雨之後(11)。溫度亦影響子囊殼形成與發育（未發表資料）。根據氣象紀錄分析，本省周年氣溫變化顯著，日平均溫以一至二月最低，約 15°C 左右，三月中旬以後，逐漸昇高，七至八月溫度最高，約 28～29°C。五月至九月由於氣溫較高，雨量分配較平均，適於子囊殼之發育，因此子囊胞子之釋放集中於此時期。

露水對黑星病菌子囊殼形成之影響，意見不一， Kiely 謂露水影響子囊胞子之釋放(6)。 Mc Onie 謂灌漑及露水對子囊胞子之釋放無顯著影響(11)。從胞子採集之結果， 58 年 1 月 28日其採集數達 32 Ascospores/m^3 air，而且其釋放集中於夜晚，此種現象頗值探討，考諸氣象因子， 該日下午起大霧，因此推測，成熟子囊殼在適當溫度下，露水可能有助於子囊胞子之釋放。若以三年所採集結果比較，則57年收集之胞子數超過58及59年之胞子總和，此種現象可能因藥劑撒佈之結果，減少感染源侵入柑桔葉片，使翌年子囊殼成熟率頓形減少。

又定期收集果園枯葉，檢查子囊殼成熟度，其結果不一。上半年收集之枯葉，子殼囊成熟度低，但下半年因溫度高，雨量分配較均勻，果園落葉容易腐爛，收集困難，致影響檢查之結果。

柑桔黑星病爲本省柑桔貯藏之重要病害，如何適時施藥防治，實爲吾人致力之目標。若能徹底瞭解黑星病之感染適期及感染源與氣象因子之關係，則可據以確立黑星病之防治步驟。本文僅就病原菌子囊胞子在新埔果園消長之情形，病原菌侵入葉片時期及影響因子，簡述觀察結果，俾有助於防治之參考。

五、摘　　要

柑桔黑星病病害之發生受氣象因子影響甚大。下雨、露水及溫度均能影響病原菌子囊殼發育及子囊胞子之釋放。本省新竹地區，黑星病菌子囊胞子之釋放，自五月下旬至九月底或十月初，其釋放時期長達四個月。由葉片組織分離之結果，黑星病菌初次侵入葉片時期與子囊胞子開始釋放之時期相互一致。通常春梢萌芽後二個月，即大量受感染，而夏梢及秋梢萌芽後不久即有可能受感染。從定期檢查果園枯葉子囊殼成熟度之結果，無法有效預測子囊胞子之釋放時期。

六、參考文獻

1. 邱人璋（1955）柑桔黑星病之研究，農林學報4：186～203。
2. 李永松（1969）柑桔黑星病病原菌不同菌株對椪柑果實病原性之探討。農業研究18（2）：45～50
3. 蔡雲鵬 （1965） 柑桔果實貯藏病害之生態研究—Ⅱ， 黑星病菌 *Guignardia citricarpa* (*Phoma citricarpa*) 之生態研究。植物保護學會會刊7(1)：5～13。
4. 末田平七（1941）柑桔黑星病病菌の寄生に關する實驗的研究。（預報）。臺灣博物會報31：416—432。
5. 澤田兼吉（1935）蜜柑黑星病發生蔓延に關する研究。臺灣農事報343， 344：632～643，712～730。
6. Kiely, T.B. (1948) Preliminary studies on *Guignardia citricarpa*, n. sp.: The ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McALP. and its relation to black spot of citrus. The Proceedings of the Linnean Society of New South Wales. 68 (5—6) : 249—292.
7. Kiely, T.B. (1969) Black spot of citrus. Agri. Gaz. N.S.W. 80 (12) : 658—662. (Abst. in Rev. Appl. Mycol. 49 : 361, 1970) .
8. Liu, K.C. (1966) Studies on citrus black spot. 1. Infection of fruit by the causal fungus. Jour. Taiwan Agri. Res. 15 (2) : 20—25.
9. McCleery, F.C. (1939) Black spot of citrus. A brief summary of control experiments, (1525—39) Agri. Gaz. N.S.W. 1, 11. (618—622) . (Abst. in Rev. Appl. Mycol. 19 : 143, 1940) .
10. McOnie, K.C. (1964) Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. Phytopathology 54 : 64—67.
11. McOnie, K.C. (1964) Orchard development and discharge of ascospores of *Guignardia citricarpa* and the onset of infection in relation to the control of citrus black spot. Phytopathology 54 : 1448—1453.

LEAF INFECTION WITH CITRUS BLACK SPOT AND PERITHECIAL DEVELOPMENT IN RELATION TO ASCOSPORE DISCHARGE OF *GUIGNARDIA CITRICARPA* KIELY

by

C. S. Huang and S. L. Chang

SUMMARY

This paper deals with the discharge of ascospore of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa* Kiely, as affected by environmental factors. Some relevant results of leaf infection and investigation of perithecial development were also given.

Using a Hirst spore trap for collecting ascospores during 1968—1970, it was found the most favorable period for ascospore discharge occurred from the end of May to early October. Rain and high temperature were important to induce the development of perithecia and discharge of ascospore. When there were mature perithecia in orchard, heavy dews could probably be effective in inducing ascospore discharge. In the Summer, the climatic factors were favorable for ascospore discharge and a large amount of such spores were released. Ascospore discharge Occurred at a very low level during the Winter and early Spring. The results of spore trapping and tissue isolation made from apparently healthy leaves indicated a coincidence of initial leaf infection with the commencement of ascospore discharge in the late part of May.

The perithecia of *Guignardia citricarpa* were present in citrus dead leaves throughout the year in Taiwan. Detection of initial ascospore discharge of the pathogen was attempted by examination of dead leaves for mature perithecia. The experiment was begun in January and carried through December 1970. Unfortunately, monthly examination of perithecia failed to give a meaningful result. The reason may be due to the small samples taken and the rapid decomposition of leaves during the hot Summer and raining season.